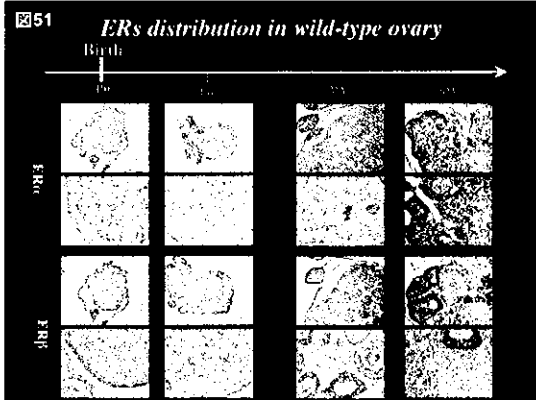
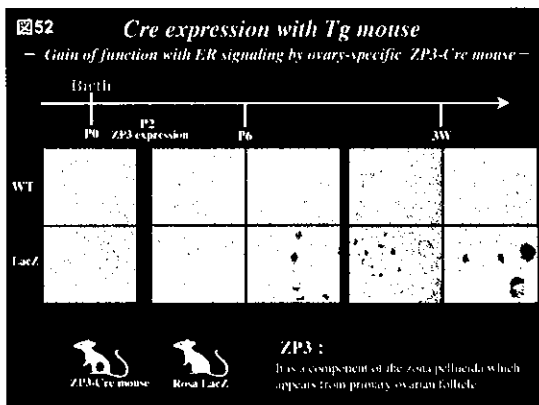


る交配する系についても検討した。卵巣



組織の卵胞および卵球細胞近位で発現し卵子を保護している Zona Pellucidae と呼ばれるカプセル様の形態を示すタンパク質は主に 3 種類から構成されており、その内の 1 つである ZP3 と呼ばれるタンパクの 프로모ター支配下に組換え酵素である Cre を融合させたマウスを得て、Cre の時期・組織特異性の検討を上述と同様にテスターマウスと交配することにより、X-gal 染色を検討した結果、生後 2-6 日目の胎児卵巣で X-gal 染色ポジティブである青色の染色が確認され、極めて卵巣の卵胞源基特異的な発現をすることを確認した(図 52)。この ZP3-Cre マウスとエストロゲンシグナルを活性化可能な cTg マウスを交配することにより、卵巣組織特異的に過剰なエストロゲンシグナルの付加を生体内で検討した。少なくとも caER α と ZP3-Cre マウスの交配により両方の遺伝子をもった 3 週齢マウス卵巣において、ヒト ER α の抗体染色により異所的な卵胞周辺組織での発現を確認した。



D. 考察

(1) 老化前立腺における新しいアンドロゲン応答遺伝子の探索

本研究は、現在普及している DNA チップによるホルモン応答遺伝子の実験的探索に代わり、バイオインフォマティクスによる転写因子結合部位の理論的探索とそれを裏付ける機能的結合部位の実験的解析の両面から、新規ホルモン応答遺伝子を網羅的に同定できる新しいスクリーニング方法を提示したものである。本研究を行っている過程で、エストロゲン応答配列(ERE)の理論的探索について報告があり、高結合性と予想される部位がヒトゲノムおよびマウスゲノムで各々約 70,000 個あることが示された。この数は、現在 Ensembl ブラウザで同定されている遺伝子数 \sim 35,000 の 2 倍にあたり、Genscan プログラムにより予想される遺伝子数 68,000 とほぼ相当することから、70,000 個の ERE のうち、ER 結合部位として機能するものは一部と予想される。また、今までにエストロゲン応答遺伝子として知られている遺伝子の転写調節領域についてゲノム検索したところ、転写開始点の近位と遠位の両方に ERE をもつものが多数見つかった。本研究では X 染色体上にランダムに同定した 21 個のコンセンサス ARE のうち、約 40% の割合で高い AR 結合性を認めており、コンピュータ解析により予想される数万個のコンセンサス ARE に近い配列のうち、機能的 AR 結合部位の割合は少なくとも数千個単位で存在する可能性が予想される。

X 染色体上のコンセンサス ARE のうち、10 個はイントロンに位置し、そのうちの 5 個は PSA プロモーター領域の ARE よりも高い AR 結合性を示した。これに対して、近傍遺伝子の 5'側 10 kb 以内に存在する ARE は 4 個で、このうち高い AR 結合性を示したのは 1 個であった。イントロンに転写因子の機能的結合部位

が存在する例は知られており、22 番染色体のゲノム DNA チップを用いた解析によれば、NF- κ B 結合部位の 40%がイントロンに存在すると報告されている。また、最近のゲノム解析の進歩により、遺伝子が染色体上に点状に存在するのではなく、センスとアンチセンスの両方向に重なり合って存在する部位も少なくないことがわかっており、ある遺伝子のイントロン上に存在する ARE が、近傍の別の遺伝子の転写調節に関与する可能性も考えられる。

X染色体上のコンセンサス ARE の 7 個については近傍にアノテーションがついている遺伝子がなく、そのうちの 6 個は遺伝子予想部位 (*ab-initio* Genscan transcript)の中に存在していた。7 個のうち、高い AR 結合性を示したものは 2 個で、1 つは遺伝子予想部位の中にあり、1 つは遺伝子予想部位の 3'側 10 kb に存在した。後者は AREX6 で、Genscan00000043157 の下流に位置し、Genscan00000043157 の mRNA 発現を検討したところアンドロゲン応答性が認められた。従って、現在近傍にアノテーションがついている遺伝子が認められていないゲノム領域においても、転写因子の機能的結合部位が存在する可能性が充分考えられる。実際、22 番染色体における NF- κ B 結合部位の解析では、22%についてアノテーションがついている遺伝子より 50 kb 以上離れていることが報告されている。

理論的に同定されてくるホルモン応答配列が機能的であるかについては、周辺のクロマチン環境が転写活性因子のアクセスしやすい場所であるか、またどのようなコアクチベータや基本転写因子が存在するかが関連してくると考えられる。本研究では LNCaP 細胞を AR 陽性の前立腺癌モデルとして用い、DU145 細胞を AR 陰性の対照モデルとして用いたが、LNCaP 細胞の AR には 877 番目のアミノ

酸変異があり (T877A)、DU145 細胞に正常型 AR を発現させた系を用いて比較することができれば、LNCaP 細胞および変異型 AR の特殊性によらないアンドロゲン応答遺伝子を評価することができると考えられる。また、本研究の手法を用いれば、選択的アンドロゲン受容体モジュレータ (SARM) の機能の違いを比較する系としても有用であると考えられる。

前立腺老化に伴い増殖を示す細胞における新しいアンドロゲン応答遺伝子の探索を行うことによって、アンドロゲンシグナル経路の具体的作用点を個々に明らかにすることができるようになり、アンドロゲン応答遺伝子を分子標的にして新しい老化・老年病予防法・治療法への応用が可能になると考えられる。

(2) 骨における新しいエストロゲン応答経路の探索

本研究から Keratin 19、Actin binding LIM protein 3、Tissue Transglutaminase が、骨芽細胞における新規エストロゲン応答遺伝子として得られた。Keratin 19 は、中間径フィラメントの一種で、骨芽細胞骨格に対する影響が示唆される。また、Actin binding LIM3 は、LIM ドメインと、F-actin との結合能をもつと考えられる VHP ドメインを有しており、細胞形態の維持や変化に対して役割を担っているのではないかと推察される。一方、Tissue Transglutaminase は、基質となるタンパクのグルタミン残基とリシン残基との架橋結合を触媒する酵素であり、これ以外にも細胞接着や、細胞内シグナル伝達に関与するという働きも有する。骨芽細胞においては Osteopontin、Bone Sialoprotein、Osteonectin、 α 2-HS-glycoprotein といった非コラーゲン性タンパクを基質とすることが報告されており、骨基質タンパクの架橋による石灰化誘導に関わるであろうことが過去の報告から示唆されている。したがって、エストロゲンが骨芽細胞において Tissue Transglutaminase の発現を

誘導し、細胞外骨基質タンパクの架橋とその後の石灰化促進に関わるという一つのモデルが考えられ、これらを分子標的として新しい骨粗鬆症治療薬の開発や評価が期待される。

(3) 骨における新しいグルココルチコイド応答経路の探索

初代培養骨芽細胞の分化誘導日数によって、共通にデキサメタゾンに応答して発現誘導される遺伝子や、日数によって発現誘導が異なる遺伝子が得られた。IGF-II mRNA binding protein は、IGF-II の mRNA に結合し、翻訳を抑制する働きをもつことが示唆されている遺伝子である。増殖期から分化誘導日数を通して発現誘導される C/EBP δ は、IGF-I 抑制作用を持つことが示唆され、MGP は、石灰化抑制、KLF9 は転写、CTGF は骨形成促進作用をもつと考えられる。分化誘導 2 週、4 週で発現誘導される Endothelin 1 は、大腿骨骨頭壊死の原因因子となり得ることが示唆され、Adrenomedulin は、骨形成促進作用を持つことが示唆される遺伝子である。分化誘導 4 週のみで発現誘導された遺伝子では、Follistatin は Activin, BMP シグナルの抑制的にはたらく因子で、NGFI-B はアポトーシス誘導に関わる因子である。この中で、我々が興味深いと考えているのは、アポトーシス誘導に関する NGFI-B である。ステロイドを生体に投与した場合、成熟骨芽細胞のアポトーシスが誘導されることが知られており、これが骨形成の低下の一要因となることが示唆されている。したがって、今回、マイクロアレイで得られた NGFI-B が、ステロイドによる骨芽細胞のアポトーシス誘導の一メカニズムとして注目され、老年者にも用いられるステロイドによる副作用としての骨粗鬆症の予防と治療の標的として役立つものと考えられる。

(4) 骨における Alox15 のステロイド応答性

骨髄間質系細胞は骨芽細胞や脂肪細胞といった様々な細胞への分化能を有する前駆細胞である。老化に伴いこれら前駆細胞の骨芽細胞への分化能は低下し脂肪細胞への分化能が亢進することが知られており、老化に伴う骨量低下の一因と考えられている。転写因子 PPAR γ を介したシグナル伝達経路は哺乳動物での脂肪細胞分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつであるマウス Alox15 遺伝子がマウスの骨量を規定する重要な遺伝子であることが示された。

マウス Alox15 と同様の機能を有するヒト遺伝子は Alox15 以外に Alox15B ならびに Alox12 と合計 3 種類が存在する。

今回、我々は初代培養ヒト軟骨ならびに骨芽細胞を用いてその発現を検討したところ分化に伴い発現が亢進した。このことから十分に分化していない軟骨や骨芽細胞ではこれら遺伝子の発現抑制を行い脂肪細胞への分化を抑制している可能性が示唆された。老化においてこれら細胞の分化が十分にすすまない一因として Alox15 遺伝子群が関与している可能性もあり今後の検討が期待される。一方、デキサメサゾンは骨髄間質系細胞において脂肪分化を誘導する因子として知られている。骨芽細胞においてデキサメタゾン添加により Alox15、Alox15B ならびに Alox12 のうち Alox15B のみが劇的に発現増加が誘導された。従って、骨芽細胞におけるデキサメサゾンによる分化成熟の障害には Alox15B が特異的に働いている可能性があり、ステロイド骨粗鬆症の標的分子手の役割が想定される。

(5) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能探索

エストロゲンは骨以外では乳腺や子宮上皮といった標的臓器の細胞増殖を強く誘導することが示されており発癌ならびに癌進展のイニシエーターとして考えられている。この分子機構においてはエス

トロゲン受容体(ER)を介したシグナル応答が中心的な役割をはたしている。ER 応答部位をその遺伝子の転写活性領域に有し、エストロゲンにより発現制御が行われるエストロゲン応答遺伝子は ER シグナルの最終段階として作用する。我々は今までに新規エストロゲン応答遺伝子として Efp を単離し、Efp が蛋白分解酵素であるユビキチンリガーゼとして機能し、乳癌細胞の増殖や進展において中心的な役割を果たしていることを示した (Urano et al., *Nature* 2002)。Efp はその N 末端より RING フィンガー、B-box、Coiled-coil ドメインを有している。このことは Efp が蛋白-蛋白相互作用を介した機能を有していることを示唆させる。したがって、Efp 結合蛋白を同定することは乳癌ならびにエストロゲン標的臓器における細胞内シグナル伝達の解明とその臨床応用へ役立つことが期待される。そこで今回、研究者は 2 ハイブリッド法を用いてヒト Efp を bait として Efp 結合蛋白を探索し、本探索より Efp そのものが結合蛋白として同定された。さらに細胞内に異なる Tag を付加させた Efp を過剰発現させることにより Efp が 2 量体以上の複合体形成を行うことを証明した。この複合体形成作用を利用して、RING フィンガーを欠落させた Efp を過剰発現させることで内在性の Efp と複合体形成を行い、ドミナントネガティブ効果により、乳癌細胞の増殖抑制を誘導することを示した。この分子標的とその制御は最近閉経後女性で患者数の増加している乳癌や、高齢者のホルモン依存性癌への新しい臨床応用を可能にするものと考えられる。また Efp の複合体形成を阻害することは Efp の機能を阻害できることが示された。研究者らは骨芽細胞においても Efp が発現すること、ならびに乳癌細胞と同様にエストロゲン添加によりその発現が誘導されることを示している。したがって今回作成した RING フィンガーを

欠落させたアデノウイルス Efp を骨芽細胞に過剰発現させて内在性の Efp の機能を低下させた時の骨芽細胞の機能の変化を検討することでエストロゲン応答遺伝子である Efp の骨芽細胞における役割を明らかにできる可能性があり、閉経後骨粗鬆症の病態の解明から治療への応用をめざすためにも有用と考えられる。

(6) エストロゲン応答遺伝子 $ERR\alpha$ の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響ならびに骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

今回、骨における ER 応答遺伝子として $ERR\alpha$ に注目し、その遺伝子多型が骨量と相関を有することならびに骨芽細胞の分化後期において $ER\alpha$ や $ER\beta$ の発現上昇と一致してその発現が上昇することを示した。 $ERR\alpha$ は、ER と同じく核内レセプターの種類であるが、そのリガンドは不明である。エストロゲンとの結合能は持たないが、ER 応答配列との結合能を有し、転写制御因子としてはたらく。 $ERR\alpha$ は骨芽細胞においてその分化後期に発現上昇することや、骨基質タンパクの 1 つである Osteopontin の産生を促進し、骨形成に関わることが示唆されていることから、骨芽細胞分化後期における ER シグナルによる骨芽細胞成熟に大きく関与している可能性がある。今後、エストロゲンによる骨芽細胞作用のメディエーターとして $ERR\alpha$ が骨形成にあたる影響に関して遺伝子の過剰発現や siRNA を用いたノックダウン等の解析により明らかにしていく。

(7) ビタミン D3 応答遺伝子 $p57^{Kip2}$ による骨形成制御機構に関する検討：
 $p57^{Kip2}$ 過剰発現安定性形質発現骨芽細胞株を用いた $p57^{Kip2}$ シグナル下流遺伝子の探索

ビタミン D 応答遺伝子である $p57^{Kip2}$ に関しては、今回 gain of function の系を用いてその下流遺伝子を検討した。その解析により、 $p57^{Kip2}$ 過剰発現骨芽細胞株で

は発現が増加する遺伝子として Osteopontin が同定された。Osteopontin は前述したように骨芽細胞から分泌される蛋白であり骨形成に大きく関与する因子である。p57^{Kip2}、オステオポンチンはともにビタミン D3 により発現誘導される遺伝子であることから、今回の結果はビタミン D3 による骨形成シグナルにおいて Osteopontin の発現制御は p57^{Kip2} を介して行われることが示された。今後、ビタミン D レセプター、p57^{Kip2}、Osteopontin ノックアウトマウス由来の骨芽細胞由来の RNA、タンパクを用いてビタミン D3/p57^{Kip2} /Osteopontin を介した骨形成シグナルに関する詳細を明らかにすることによりビタミン D シグナルの新たな下流シグナルが明らかとなることが期待される。

(8) 低用量エストロゲンの内膜肥厚抑制作用

本研究では、2 μ g/kg/day 以下の E2 投与でも、ラット頸動脈内膜形成は十分に抑制され、しかも子宮と血清脂質に対しては最小限の影響ですんだ。E2 を含むエストロゲンの投与が内膜肥厚を抑制することは、様々な動物モデルで報告されている。しかし、我々の以前の報告を含めて、いずれも血中 E2 濃度が卵巣摘出を行っていない対照群を上回る程度の投与量であり、低用量エストロゲンの効果は検証されていなかった。本研究では、過去の報告同様、10~20 μ g/kg/day の E2 投与により血清 E2 濃度は sham 手術群の3倍以上に上昇し、2 μ g/kg/day の E2 投与で sham 群と同程度であった。1 μ g/kg/day 以下の E2 投与量では、血清 E2 濃度が上昇しなかったばかりか血清脂質も変化せず、0.2 μ g/kg/day の E2 では子宮重量の増加も有意なものではなかった。これらの結果は、循環血液中の E2 濃度が上昇していなくても組織・細胞レベルではエストロゲンの作用が発揮されうることを意味し、有害作用の観点からエス

トロゲンの投与量を考える際のヒントを与えてくれる。本研究は動物実験であり、直接臨床に反映させることはできないが、最近検討されつつある低用量 HRT の論拠になる成果といえよう。

(9) ラット血管平滑筋におけるエストロゲン応答遺伝子の検索と同定

ほとんど平滑筋層からなるラット大動脈組織で、エストロゲンに反応して発現が増加する 4 種類の遺伝子を同定した。これらのうち、caveolin-1 については血管平滑筋細胞でエストロゲンが ER α を介して転写活性を高めることが報告されているが、他の 3 遺伝子についてはエストロゲンによる発現調節の報告はない。

caveolin-1 は細胞膜のカベオラ分画に存在し、細胞内シグナル伝達を介して細胞機能、血管トーン調節に関与する。したがって血管平滑筋細胞におけるエストロゲン応答性の caveolin-1 発現増加は血管機能改善につながる可能性がある。SmLIM と enigma は、double-zinc-finger 構造を有する LIM タンパクに属し、タンパクの相互作用により細胞の増殖や分化に関わるとされる。特に SmLIM は血管平滑筋で大量に発現し、平滑筋細胞の分化過程で発現してくる。enigma は PDZ-LIM タンパクで、アダプタータンパクとしてキナーゼやホスファターゼと結合して細胞機能調節に関わる。一方、Id3a は Id3 遺伝子の alternative splicing により産生され、helix-loop-helix 型転写因子として平滑筋細胞の増殖、分化に関わることが報告されている。これら 3 つの転写因子の機能から考えて、エストロゲンによる血管トーン調節や血管平滑筋細胞の増殖・分化に関係することが想定され、今後検討を行う必要がある。エストロゲンによる 4 遺伝子の発現調節機構についても、今回の研究では明らかでない。エストロゲンによる caveolin-1 の転写調節を検討した報告(Razandi, 2002)では、3 kb のプロモーター領域に典型的エストロゲ

ン応答配列は存在しなかった。また、他の 3 遺伝子についてはプロモーター配列がわかっていない。今後、4 遺伝子についてエストロゲンによる発現調節機構と機能的役割を解析していくことが、血管特異的に好ましい作用を発揮しうる HRT を模索する基礎となるものと考えられる。

(10) 血管平滑筋細胞(VSMC)および心筋線維芽細胞(CF)増殖における ER サブタイプの役割

本研究では、いずれの ER サブタイプが VSMC および CF の増殖抑制作用に関与しているかを明らかにする目的で ER α および ER β を組み込んだアデノウイルスを作製した。非感染の VSMC および CF ではエストロゲン添加によりエストロゲン応答配列の転写が活性化し、増殖抑制作用を示した。VSMC に ER α あるいは ER β を過剰発現させると、それぞれ転写活性の増加を認めたが、VSMC 増殖抑制作用は ER α ではなく ER β においてリガンド依存性に増強した。一方 CF では、両サブタイプともに過剰発現により転写活性、増殖抑制効果は増強された。

以前のわれわれの報告や他の施設からの報告において、エストロゲンは VSMC および CF の増殖を抑制することがすでに明らかになっている。また、ER アンタゴニストである ICI182,780 あるいはタモキシフェンがエストロゲンの増殖抑制作用に拮抗することが報告されており、エストロゲンの VSMC および CF 増殖抑制作用は ER を介することを示唆する。しかし、これらの阻害剤は ER サブタイプの選択性はなく、さらにタモキシフェンは臓器によってアゴニスト作用を有する。したがって、本研究によって、VSMC では ER β が、CF では ER α 、ER β の両者が増殖抑制を介することが初めて明らかになった。それではエストロゲンの増殖抑制作用において ER サブタイプ間でどのような差異があるのだろうか？また、VSMC と CF で結果が異なる理由は何で

だろうか？リガンド結合能の違い、下流のエストロゲン応答遺伝子あるいは応答シグナルの違い、ER に結合する共役因子の違いなどが可能性として挙げられる。本研究では ER の転写活性がサブタイプ間でほぼ同等であり、細胞増殖抑制作用におけるサブタイプ間の相違は応答遺伝子の発現、共役因子の結合の相違によるのかもしれない。エストロゲンによる増殖抑制作用に関連する細胞内シグナル伝達経路としては MAPK 活性の抑制、MAPK ホスファターゼ-1 の発現およびチロシンホスファターゼの活性の上昇、cyclic AMP-アデノシン経路を介するなど、いくつかの研究から明らかにされている。これらの点は本研究からは明らかでなく、今後の検討課題である。また、今回の研究は培養細胞レベルの検討であり、臨床研究へフィードバックするためには少なくとも動物実験により心血管病変形成に対する作用を検討する必要がある。

(11) 高齢男性における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標および日常生活機能との関連

後期高齢者を中心とした物忘れ外来の男性患者において、血中テストステロン濃度の低下が機能診断および画像診断上の動脈硬化と関連する可能性が示された。この結果は、中高年男性を対象とした欧米の症例対照研究や疫学研究の結果と一致する。ただし、今回は症例数が少なく、多変量解析では年齢の影響を無視できなかった。今後、より多数例で解析する必要があるとともに、テストステロン補充療法やその代替療法の効果について検討していかなければならない。一方、男性の DHEAS については同様の関係がみられず、女性ではむしろ DHEAS 高値が PWV 高値と関連した。動脈硬化とアンドロゲンとの関係において性差が存在するとともに、アンドロゲンでもテストステロンと DHEA では意味が異なるのであろう。この点も、健常高齢者を含むより

幅広い高齢者層で検討していく必要がある。

(12) 虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能

虚弱高齢者において、血中テストステロン濃度の低下が全般的日常生活機能障害と関連することを見出した。これまでに、テストステロン濃度の低下が虚弱高齢男性の移乗、食事に関する ADL と関係するという報告、地域在住高齢者で認知機能と関係するという報告があるが、いわゆる総合機能評価の手法による研究は本研究が初めてである。高齢者における日常生活機能の低下には様々な原因があるが、脳虚血病変による痴呆や運動麻痺、失調、冠動脈疾患による心機能低下、閉塞性動脈硬化症による歩行障害など動脈硬化を背景とするものが多い。したがって、上記高齢男性患者で示されたようなテストステロン低下と関連した動脈硬化が日常生活機能障害の要因となっている可能性も示唆される。今後は、全般的な日常生活機能改善効果を目的としたテストステロン補充療法の模索を行う必要がある。

(13) エストロゲンの non-genomic 作用の解析

本研究は、2000 年以降、相次いで発表されたエストロゲン受容体と細胞内シグナル伝達系との直接のクロストークのモデルに基づき、その種々の臓器における生理作用を明らかにする目的で推進してきているが、現時点での一番大きな問題点は、発表されている non-genomic な反応と全く同じ細胞や培養条件、刺激方法を用いても、例えばエストロゲン刺激による MAP キナーゼの活性化などはごくごく僅かしか観察されず、論文のような顕著な変化が起きないということである。今に至るまでこの問題は解決せず、このことがこの研究が初年度から手間取る大きな要因となった。同時に内在性のエストロゲン受容体をきれいに描出でき

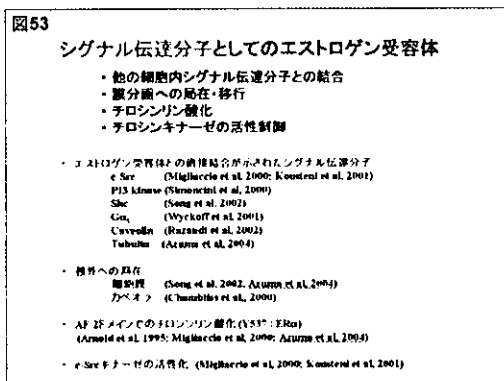
る抗体がなく、ほとんどの実験が外からタグを付加して発現させた受容体の挙動を観察するものとなってしまったのも残念である。チロシン 537 のリン酸化に関してもリガンド刺激の有無によるリン酸化の程度の差が認められれば、まさにリガンドの下流の直接のシグナル伝達経路として興味深いのが、現在のところ恒常的チロシンリン酸化のようなので non-genomic なシグナルの調節部位としての役割は少ない可能性がある。

それでもこの方法によって同定されたチューブリンは、膜局在タイプの AF-1 にのみ結合するという特異性から、その機能に興味を持たれる。通常の微小管の機能におけるエストロゲン受容体の役割という面だけでなく、免疫細胞染色の結果から、細胞辺縁で細胞運動や細胞間接着などに関わるシグナル・分子輸送などに関与していることも考えられ、生理的意義を更に探っていく必要がある。またこれから AF-2 のチロシンリン酸化部位に結合する蛋白質など膜内複合体構成成分が微量なものに至るまで明らかになれば、自ずと受容体の膜における役割についても浮き彫りになるものと期待される。膜特異的な結合ではなかったものの、もう一つ同定された Hsp70 は通常、細胞内で分子シャペロンとして機能し、ATP を利用してタンパク質のフォールディング、輸送、集合や分解などに関与することからチューブリンとの結合に強調して働く可能性なども考えられこちらも更なる機能解析の必要性が残った。

一方、今回のアプローチの反省点として、ここ数年の質量分析技術の進歩によって、蛋白質複合体解析が今までより遙かに微量の蛋白質で行えるようになったが、それでもまだ細胞内シグナル伝達分子のように絶対量が少ない蛋白質群にとっては、非常に多くの材料からスタートする必要があったということである。一般にシグナル伝達分子は往々にして蛋白

質としての絶対量が少なく、プロテオミクスなどの網羅的解析に引っかかってこない分子も多い。ステロイドホルモンの複合体解析においても、核内作用に関わる複合体に比べて、核外作用に関与する複合体成分は極めて微量で、今回も精製源として数々の細胞群を試みたが、non-genomic作用が多くのグループにより示されている MCF-7 細胞の大量培養から相互作用する分子のうち発現の絶対量が多いものを 2 種類同定することができただけで、神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞などからこのような複合体成分の解析に進もうとすると、蛋白質精製のスケールアップが必要となり、多大な時間と労力を要することが明らかになった。今回我々が発見し発表した知見も併せて、これまでにエストロゲン受容体が核外でシグナル伝達分子の一つとして働く事を支持する情報を図 53 にまとめた。

より包括的にエストロゲン受容体が伝える生理的なシグナルを理解する為には、



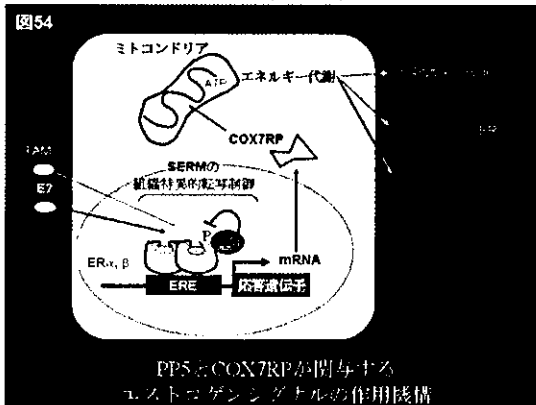
さらに特異性及び感度の高い抗体を開発することに加えて、環流法を用いた初代培養細胞の立体培養などにより蛋白質サンプルを大量に調整する条件を検討することや、正常細胞に近い不死化細胞株を利用することなど超大量培養のための技術・設備の開発と、更なる質量分析の高感度化が必須であろうと考える。

(14) エストロゲン受容体修飾因子 PP5 とエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の同定とその機能解析

ER の転写活性の制御にリン酸化が重要な働きを担っており、中でも ER α S118 のリン酸化は細胞増殖因子によって活性化される MAPK を介して誘導されることが知られており、特にホルモン非依存性の ER の活性化(ER の AF-1 の活性化)に重要な機能を有していると考えられている。また、ER α S118 のリン酸化はエストロゲン刺激によって CDK7 を介しても起こり、細胞増殖因子とエストロゲンシグナルのクロストークの場としても重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら ER α S118 の脱リン酸化の機構についてはほとんど知られていなかった。本研究により、ER α S118 の脱リン酸化酵素として PP5 を同定し、PP5 は ER の転写活性を負に制御していることが示された。抗エストロゲン剤として開発されたタモキシフェンは、乳腺に対してはアンタゴニストとして働き、乳癌の治療に使用されているが、一方でタモキシフェンは子宮内膜に対してはアゴニスト作用を有し、子宮内膜癌の危険率を上昇させることが知られている。タモキシフェンのこのような組織特異的な作用は ER の AF-2 の活性を阻害するが、AF-1 の活性は阻害しないことに依ることが示唆されている。タモキシフェンによって ER α S118 のリン酸化が誘導されることが観察されており、抗エストロゲン剤の組織特異的な作用を PP5 が制御している可能性が考えられた。

エストロゲン応答遺伝子である COX7RP の発現は Ishikawa 細胞においてはタモキシフェンによって誘導されたが、MCF7 細胞においては誘導されなかった。COX7RP の細胞特異的なタモキシフェン応答性は、このようなタモキシフェンの組織特異的な作用を説明する機序の一つと考えられた。また、COX7RP タンパクはミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼ(COX)の酵素活性を促進することにより、細胞増殖や造腫瘍能の亢進に寄与

することが示唆された。このようなエストロゲンシグナルならびにミトコンドリア機能は老化と密接に関与していると考えられており、これら 2 つの経路に関わる COX7RP の機能解明は、老年病における新たな予防、治療法に繋がると考えられた。エストロゲンは痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症などの老化に伴う病態と深く関わっていることが知られており、その作用を媒介する ER の PP5 による脱リン酸化制御機構ならびにエストロゲン応答遺伝子である COX7RP の機能の解明は老年病における新たな予防、治療法に繋がる可能性が示唆された(図 54)。



(15) エストロゲン受容体を介した心筋細胞保護作用に対するレドックス制御分子の意義

多くの生活習慣病による疾病発症の基盤に心血管の病的老化が存在する。この心血管系組織細胞の機能低下には酸化ストレス障害が関与すると考えられている。すなわち心血管細胞が酸化ストレスを感受して防御する機能の低下が老化を進展させるという考え方である。しかし、その詳細な機序は未解明であった。

E2 が酸化ストレスに対する細胞保護作用を示すことは、既によく知られている。この細胞保護作用に、PI3-Kinase/Akt signal pathway が関与することがわれわれの研究で明らかになった。最近同様の報告がなされている。(Yu X et al. J Biol Chem, 2004, Koga M. et al. Biochem Biophys Res Commun., 2004)。しかしながら、こ

の Akt を介した抗アポトーシスシグナル制御の詳細は未解明であった。今回、E2 前投与によって抗酸化物質の中心をなす g-GCS とともに thioredoxin family の GRX の発現が酸化ストレスに反応して上昇することを始めて明らかにした。

シグナルの強弱はレドックスで調節されている。申請者はこれまでに、酸化ストレスによる細胞障害を防御する上で、GSH が重要であることを検討してきた。GSH は抗酸化物質として重要であるばかりでなく、酸化型グルタチオン(GSSG)を低く押さえ、GSH/GSSG を高く維持し、さらに酸化ストレスに反応するシグナル伝達分子のリン酸化活性を直接制御する GRX の基質としても重要である。これらシグナルスイッチの ON/OFF を制御する因子が E2 によって発現上昇することは、E2 の細胞保護作用の中心となると考えられる。今後更に、GSH と GRX の細胞保護における調節機構を明らかにする必要がある。

レドックスは、一般的にタンパク質の合成や成熟、酵素、受容体、転写因子などの構造や機能の制御に重要である。近年、シグナル伝達分子において、個々の因子のリン酸化部位の近傍に存在する特定の Cys 残基が還元型であることが活性の発現に重要であるとの報告が見られるようになっている。しかしながら、その詳細な調節機構はまだ解明されていない。GRX は GSH を基質とし、NADPH を補酵素とする酵素タンパクである。活性中心は Cys-Pro-Tyr-Cys である。GRX は、酸化ストレスでジスルフィド結合をしたり、GSSG で glutationyl 化されたタンパク質の Cys 残基を還元する。これらを踏まえて下、Akt の Cys 残基の酸化還元状態を測定したところ、E2 は Akt の Cys を還元状態に保つことを明らかにした。このことは、E2 によって GRX が活性型に維持されることを示している。最近、細胞内シグナル分子 Ras やカルシウム輸

送の担い手 SERCA が酸化ストレスで glutathionyl 化されることが、細胞機能に大きな意味をもつことが報告されてきている。今回の研究成果も、老化とその防御に対する今後の研究発展に寄与することと思われる。

(16) 老化と神経変性疾患におけるステロイド受容体転写調節機構の解明とその応用

本研究はショウジョウバエの分子遺伝学を駆使した解析系を構築し、機能遺伝子を同定・性状解析した。現在ヒトとショウジョウバエの機能遺伝子は解読済みであり、その構造・機能ともに高く保存されていることが判明している。従ってショウジョウバエ中で機能するヒト ER α および AR は性ステロイドホルモン作用機構を分子遺伝学的に解析できるツールとなり、標的遺伝子のクロマチン構造を考慮した解析系には格好のモデル個体と言える。

神経変性制御遺伝子の同定により、転写開始や終息因子、転写伸長、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング等機能が推測される因子を複数同定することに成功した。すなわち神経変性機構の一端がクロマチン構造変換を伴う転写制御機能の破綻、染色体 DNA 構造変換維持機能の衰退が考えられた。これまでヒストン脱アセチル化活性やアセチル化活性は神経変性制御に拘わることは報告されていたが、本研究結果から、ヒストン修飾のみならずクロマチン構造変換も非常に重要であることが判明した。AR polyQ と Rb の相互作用は E2F-1/Rb 複合体の転写調節機構の破綻を生じることが示唆し、polyQ 依存的な PHD finger との相互作用は、クロマチン構造維持に破綻をきたす可能性を示唆した。また、生化学的アプローチにより AR polyQ がクロマチン画分に局在することを見出した。以上の成果を踏まえると、神経変性機構と転写制御は共通したクロマチン上のイベントで

あり、神経変性が遺伝情報伝達のあるクロマチン構造状態の異常により転写制御や細胞周期の破綻を生じると推測された。現在この神経変性疾患は治癒法がないばかりか加齢に伴い亢進し最終的に致死となる難病であることから、これら破綻機構の解析は神経変性発症抑制や治療に大きく貢献できると期待する。最終的に神経変性の促進とステロイドホルモン作用の低下・衰退はクロマチン上で協調的作用に発揮されることから、老化に伴うヒストン修飾およびクロマチン再構築機構のより詳細な把握はこれらクロストークの分子機構を明確にできると考えられた。

一方、個体レベルでクロマチン構造を考慮した AR 転写系を構築し既知転写共役因子のクロマチン構造変換機能を評価することに成功した。既知転写共役因子でありヒストンアセチル化修飾し転写活性化すると考えられる CBP がヘテロクロマチン上で抑制的に働く知見は初めての報告であり、ヒストン H3 Lys9 がメチル化を亢進することを見出した。今後 CBP 機能はどのような転写抑制機構を介するか、ヒストン修飾を介した詳細な転写制御解析を進展させる予定である。

最終的に polyQ 依存的神経変性において AR 転写の足場となるクロマチン構造の障害により、AR 転写活性の低下を導くことが示唆された。すなわち神経変性の促進とステロイドホルモン作用の低下・衰退はクロマチン上で協調的に発揮されることから、老化に伴うヒストン修飾およびクロマチン再構築機構のより詳細な把握はこれらクロストークの分子機構を明確にできると考えられた。

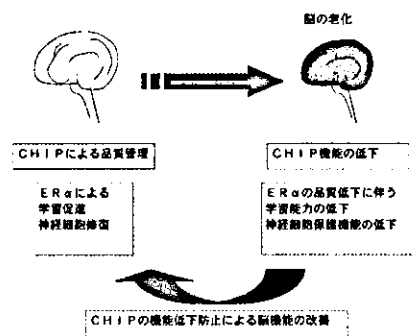
(17) 脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用

エストロゲンが細胞質に存在する ER α と IGF-1 受容体との相互作用を誘導し、IGF-1 受容体のリン酸化、引いては MAP キナーゼ、Akt の活性化を引き起こすこ

とを示した。エストロゲン依存的な MAP キナーゼおよび Akt の活性化には、必ずしも IGF-1 受容体は必要ないことから、そのほかの因子が ER α と細胞質で相互作用し、MAP キナーゼと Akt pathway の活性化を行っているものと考えられた。GST-ER α カラムを作製して ER α にエストロゲン依存的に結合する細胞質蛋白質を精製・同定したところ、カルモジュリンとストリアチンが得られた。カルモジュリンは細胞内のカルシウム・モジュレーターであり、カルシウムと結合して CaMKII などを活性化し細胞増殖、樹状突起伸長など様々な過程に関与することが報告されている。しかしながら、その分子機構の詳細は明らかになっていない。ストリアチンは脳において豊富に存在し、神経突起終末にカルモジュリンと結合して存在することが報告されている。ER α も樹状突起の棘突起部位に局在すること、エストロゲンが樹状突起の伸長に関与することから、ER α 、カルモジュリン、ストリアチンは複合体を形成してエストロゲン依存的な樹状突起伸長に関与しているものと考えられる。そこで、樹状突起伸長での ER α 機能の老化にともなう変化について解析を進めるために ER α の品質管理機構について解析を行った。その結果、ユビキチン・リガーゼである CHIP が機能低下を起こした ER α に選択的に結合し、ユビキチン化することによって分解を促進していることを見出した。CHIP による ER α の分解は細胞質で起こっていることから、ER α の品質管理はエストロゲン依存的な IGF-1 シグナル伝達制御においても極めて重要な役割を担っているものと考えることが出来る。ER α 品質管理機構の破綻は、エストロゲン依存的な IGF-1 シグナル伝達の脱制御を引き起こし、シナプス突起伸長の低下、神経細胞の修復異常などに伴う記憶低下などに繋がる可能性がある(図 55)。

さらに、本研究で、乳がん患者 30 例

図55



の癌部・非癌部での CHIP の発現量を検討したところ、癌部で CHIP 発現量の有意な低下を認めた。この結果は、蛋白質の品質管理機構の破綻が、癌化に繋がりうることを示唆している。今後、老化に伴う CHIP 依存的品質管理機能の低下について検討するとともに、CHIP とシナプス突起伸長、神経細胞修復などの諸過程との関連について研究を進めたい。

(18) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用

エストロゲンと卵巣機能に関しては、ほ乳類であるマウスにおいては胎生 14 日胚からエストロゲンレセプターが発現し始め、卵巣の発達に伴い生後 11 日前後からエストロゲンの生合成が始まると考えられる。さらに雌性の二次成長に伴い卵巣が発達し、性周期により他のホルモンと厳密に相互作用しながら制御することにより、女性生殖を維持していることが考えられている。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、血管疾患、およびホルモン依存性ガン等と深く関連することが示唆されている。

本研究により、エストロゲンシグナルが卵巣機能の黄体化作用に関与することが示唆され、下流応答遺伝子の 1 つである PR の発現を制御していることが推測される。1 つのモデルとして、卵巣においてエストロゲンシグナルがプロゲステロンシグナルを階層的に制御する可能性

を示唆している。また、エストロゲンレセプターの下流応答遺伝子であるEBAG9、および Efp についても、生体内で過剰な ER α シグナル付加することにより転写を上昇させることが示唆された。とりわけ、Efp は乳癌の細胞増殖における重要な因子であることを研究代表者および分担者により既に報告しており、ガンとの関連について生体内での作用メカニズムを解明することは重要と考えられる。

発生初期からエストロゲンシグナルが過剰に付加された場合、ほとんどのマウスでメンデル法則から逸脱して胎生期に致死となることが示唆されたが、妊娠期にエストロゲンシグナルが細胞増殖・分化に関与する可能性が示唆された。実際、エストロゲンシグナルが欠如した ER KO マウスにおいて、ER α KO では受精障害、性周期の異常、排卵障害等が報告、ER β KO では排卵障害、出産数の減少等が報告されており、エストロゲンシグナルの卵巣機能を解析していくためには、時系列的に解析を検討していく必要性が示唆された。

これらの研究を進展させるためには、エストロゲンシグナルの作用機序はいまだに未知の機能が多く存在し、個々の疾患に焦点を絞り、標的臓器・時間軸を換えて疾患モデルマウスを応用して本来エストロゲンが持つ生体作用を明確する必要性があると考えられる。さらに、1つのステロイドシグナルの減衰・破綻による病態メカニズムを理解するためには、生体内で総合的にステロイドシグナルの相互作用・制御機構を解明することが、新しい老年病の予防・治療法の開発を行うのに必須と考えられる。

E. 結論

本研究では、発表業績に示すように、主任研究者は TG2、PCYT1B、Alox15B をはじめとする、骨と脳、生殖系におけ

るエストロゲン、アンドロゲンならびにグルココルチコイドの標的因子を複数のアプローチによって明らかにし、抗老化・老年病治療と診断の分子標的としての役割を示した。秋下は、心血管への抗老化作用を介する ER とその標的因子の役割を明らかにし、また血管と脳における臓器特異的作用を臨床研究と動物モデルを用いて示し、新しい治療法への可能性を示唆した。堺は、細胞内シグナル伝達の研究から、エストロゲンの non-genomic action を分離し、新しいステロイドシグナル経路を見出した。池田は、エストロゲン受容体修飾因子として PP5 を同定するとともに、エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の発現制御と機能解析から SERM の組織特異的作用とミトコンドリアと老化との関係を示唆した。近藤は、心血管系老化におけるレドックス制御に Akt が関与することを示し、武山は、エストロゲンとアンドロゲン受容体の新しい転写調節機構と標的分子を明らかにする一方、神経変性疾患の病態モデルを開発し、アンドロゲン誘導体を用いる新しい治療法を検討した。柳澤は、ステロイド受容体の新規共役因子を同定し、さらにエストロゲン受容体蛋白分解の新しいメカニズムを明らかにした。これは、エストロゲンの脳保護作用において、老化と関連の深い IGF 経路とクロストークし臨床への応用が期待される。津久井は、発生工学を応用して、遺伝子改変動物による老化、老年病疾患モデルマウスを開発した。以上のように、臨床、基礎医学の基盤のもとに、各ステロイド受容体の新しい作用機構と新規共役因子、シグナル因子、標的因子を探索同定し、遺伝子改変動物の作製から老化、老年病のモデル動物を開発し、*in vivo* での機能解析から、新しい診断、治療法の分子標的を 10 個以上見出し、新たな創薬のシードとなることが期待される。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 101-104, 2003
2. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer* 106, 310-315, 2003
3. Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T: Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1333-1340, 2003
4. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M: EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer* 39, 1552-1561, 2003
5. Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S: Idoxifene and estradiol enhance antipoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes. *Dig Dis Sci* 48, 570-580, 2003
6. Horie K, Urano T, Inoue S: Efp as a new molecular target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 14, 1-2, 2003
7. Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T: Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *J Mol Endocrinol* 30, 301-315, 2003
8. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H: Estrogen receptor (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 thyroid disorders. *Modern Pathology* 16, 437-444, 2003
9. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B: Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR. *J Biol Chem* 278, 43919-43917, 2003
10. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M: Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density. *J Bone Miner Res* 18, 1642-1649, 2003
11. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H: Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing. *Bone* 32, 185-190, 2003
12. Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of Tumor Necrosis Factor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 3, 101-105, 2003
13. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in low-

- density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 22, 341-345, 2004
14. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18, 1131-1143, 2004
 15. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1312-1317, 2004
 16. Tamura N, Hishikawa Y, Ejima K, Nagasue N, Inoue S, Muramatsu M, Hayashi T, Koji T: Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis human breast cancer. *Lab Invest* 84, 1460-1471, 2004
 17. Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H: Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 218, 147-153, 2004
 18. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N: Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clin Cancer Res* 10, 2687-93, 2004
 19. Akahira J, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N: Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 90, 2197-2202, 2004
 20. Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, Horie-Inoue K, Sasano H, Kitamura T, Ouchi Y, Inoue S: 14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 795-800, 2004
 21. Fujita M, Urano T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 4, 175-180, 2004
 22. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Mario M: Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* 203, 193-201, 2005
 23. Ikeda K, Inoue S: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*, in press
 24. Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res*, in press
 25. Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxxygenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, in press
 26. Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y: 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 454-459, 2003
 27. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita

- N, Ouchi Y: Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 59, 734-744, 2003
28. Nakamura T, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Orimo H, Ouchi Y: Influence of sex and estrogen on vitamin D-induced arterial calcification in rats. *Geriatr Gerontol Int* 3, 145-149, 2003
29. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Testosterone and comprehensive geriatric assessment in frail elderly men. *J Am Geriatr Soc* 51, 1324-1326, 2003
30. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K, Ouchi Y: Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 75, 1219-29, 2004
31. Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K, Ouchi Y: Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *Eur J Pharmacol* 502, 265-270, 2004
32. Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K: Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis; flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 173, 13-18, 2004
33. Nagai K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia. *J Am Geriatr Soc* 52, 1037-1038, 2004
34. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Nakai R, Toba K: Effects of physical exercise on plasma concentrations of sex hormones in elderly women with dementia. *J Am Geriatr Soc* in press
35. Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R: Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma *J Biol Chem* 278, 48367-48376, 2003
36. Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H: Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23, 1075-1088, 2004
37. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Tubulin association and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor at the plasma membrane. *FEBS Lett* 577, 339-344, 2004
38. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori M: Hippocampal Synaptic Modulation by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor. *J Neuroscience* 25, 1826-1835, 2005
39. Miyake I, Hakomori Y, Musu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, in press
40. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, in press
41. Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Kikuchi A, Kayama F: Estrogen and phytoestrogen regulate the mRNA expression of adrenomedullin and adrenomedullin receptor components in the rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 223, 27-34, 2004
42. Arao Y, Kikuchi A, Kishida M, Yonekura M, Inoue A, Yasuda S, Wada S, Ikeda K,

- Kayama F: Stability of A+U-rich element binding factor 1 (AUF1)-binding messenger ribonucleic acid correlates with the subcellular re-localization of AUF1 in the rat uterus upon estrogen treatment. *Mol Endocrinol* 18, 2255-2267, 2004
43. Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function* (Edited by Iuchi S and Kuldell N) Landes Bioscience, Georgetown, in press
44. Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T: Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt. *J Biol Chem* 278, 50226-50233, 2003
45. Yasuoka C, Ihara Y, Ikeda S, Miyahara Y, Kondo T, Kohno S: Antiapoptotic activity of Akt is down-regulated by Ca²⁺ in myocardial H9c2 cell. – Evidence of Ca²⁺-dependent regulation of protein phosphatase 2Ac. *J Biol Chem* 279, 51182-51192, 2004
46. Kamada K, Goto S, Okunaga T, Ihara Y, Tsuji K, Kawai Y, Uchida K, Osawa T, Matsuo T, Nagata I, Kondo T: Nuclear glutathione prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced pS-transferase formation of exocyclic DNA adducts. *Free Radical Biol Med* 37, 1875-1884, 2004
47. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Androgen receptor functions from reverse genetics models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 95-99, 2003
48. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Yanagisawa J, Chambon P, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Activation of estrogen signaling by dioxin-induced association AhR with ER. *Nature* 423, 545-550, 2003
49. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 23, 1598-1608, 2004
50. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shiode Y, Yamamoto A, Suzuki E, Maki A, Yamagata K, Zhao Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1209-1215, 2004
51. Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K: Function of androgen receptor in gene regulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 627-633, 2004
52. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Wnt/beta -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279, 40255-40258, 2004
53. Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shiode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: In vivo potentiation of human oestrogen receptor by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells* 9, 983-992, 2004
54. Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 26704-26714, 2003
55. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is

- impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917, 2003
56. Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23, 4813-4823, 2004
57. Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23, 6000-6005, 2004
58. Fukuda A, Tokonabe S, Hamada, M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIF. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003
59. Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K: Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24, 6525-6535, 2004
2. 学会発表
【国際学会】
1. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D. International Bone and Mineral Society 2003, Osaka (2003.6.3-7)
2. Ishida R, Sudo Y, Ezura Y, Yoshida H, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium within the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Adult Bone Mineral Density. American Society of Bone and Mineral Research 25th Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA (2003.9.19-23)
3. Urano T, Fujita M, Shiraki M, Hoshino S, Ouchi Y, Inoue S: Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
4. Hoshino S, Inoue S, Ouchi Y: Monitoring bone resorption by serum type I collagen N-telopeptides (NTX) predicts change of bone mineral density in postmenopausal Japanese women. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
5. Inoue S: [Invited Seminar] The role of 14-3-3sigma proteolysis in breast cancer growth. Biology of 14-3-3 Proteins. Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA (2004.2.22-27)
6. Inoue S: [Workshop] Estrogen responsive genes and breast tumors. The US-Japan Workshop on "The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis", Maui, HA, USA (2004.3.21-23)
7. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive gene in the growth control of breast tumors. 3rd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka (2004.4.15-18)
8. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: [New Investigator Award] SNP detection implicated in Wnt-beta-catenin signaling molecules as a genetic marker for involutional osteoporosis. The American Geriatrics Society, 2004 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, NV, USA (2004.5.17-21)
9. Inoue S: [Symposium] "Molecular and cellular analysis of steroid hormone

- receptor: Expression and its role in reproductive organs” Estrogen receptors and their downstream targets in breast tumors. 16th International Congress of the IFAA (International Federation of Associations of Anatomists), Kyoto (2004.8.22-27)
10. Inoue S: [Symposium] Downstream targets for sex steroid hormone receptors. Nagasaki Symposium on The Nuclear System to Decipher Operation Code (DECODE) for Biological Response, Nagasaki (2005.2.28-3.1)
 11. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Relationship between plasma androgen levels and comprehensive geriatric assessment The American Geriatrics Society Annual Meeting, Las Vegas, USA (2004.5.18)
 12. Akishita M, Kobayashi K, Machida A, Sonohara K, Toba K: Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia. The American Geriatrics Society Annual Meeting, Las Vegas, USA (2004.5.18).
 13. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on modification of signaling cascades in cancer, Tokyo (2003.1.8-11)
 14. Sakai R: “Roles of Src-binding molecules in the control of cancer progression” The eighteenth workshop on France-Japan cooperative cancer research program, Osaka (2003.10.28-11.1)
 15. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: Involvement of Eph receptor tyrosine kinase and ephrin ligand in the regulation of cell-to-cell adhesion by interaction with claudins. 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa, Hawaii, USA (2004.1.25-28)
 16. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: “Biological roles of hyperphosphorylated ShcC docking protein in neuroblastoma cells.” 11th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Genova, Italy, (2004.6.16-19)
 17. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Analysis of estrogen receptor signaling complex at the plasma membrane. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal (2004.8.31-9.4)
 18. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie K, Usui T, Muramatsu M, Inoue S: Negative regulation of transcription activity of estrogen receptor by protein phosphatase 5. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
 19. Ikeda K, Inoue S: The estrogen-responsive gene COX7RP is a direct target of Estrogen-related receptor alpha and exhibits tumor-promoting activity in endometrial cancer. The Japanese Biochemical Society International Symposium in 2005, New Frontier of Transcription Research, Kusatsu (2005.1.11-12)
 20. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress-induced cell death in cardiac H9c2 cells. SFRBM’s 10th Annual Meeting, Seattle, Canada (2003.9.20-24)
 21. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress – induced cell death in cardiac H9c2 cells. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 22. Kondo T: Impairment of the activity of transcription factor by oxidized LDL in macrophages. The 13th International symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)
 23. Kondo T: Clinical evaluation of oxidative

stress in cardiovascular disease. The 13th International symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)

24. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Suzuki E, Maki A, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: TRAP240, as a component of the mediator complex, represses transactivation function of androgen receptor Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
25. Shirode Y, Takeyama K, Kato S: A serum protein regulates VDR transactivation by a novel vitamin D analogue, ED-71. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Washington DC, USA (2004.10.1-5)
26. Junn Yanagisawa: Estrogen receptor are Regulated by Two Independent Ubiquitin-Proteasome Pathways. The 3rd International Nuclear Receptor Meeting in Japan, Osaka (2004.4.14-18)

【国内学会】

1. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲンの作用の分子機序と骨代謝、脳機能における役割 (2003.4.1) 第 100 回日本内科学会 (福岡)
2. 井上聡：[シンポジウム]標的遺伝子から見たエストロゲン作用メカニズム (2003.4.4-6) 第 26 回日本医学会総会 (福岡)
3. 井上聡[サテライトシンポジウム]女性ホルモンとその応答遺伝子の作用メカニズム (2003.5.9-11)第 76 回日本内分泌学会 (横浜)
4. 浦野友彦、星野眞二郎、白木正孝、江面陽一、江見充、細井孝之、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症における LRP5 遺伝子多型の関与 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
5. 星野眞二郎、井上聡、大内尉義：血中ならびに尿中 I 型コラーゲン N-telopeptide (NTx)の骨代謝マーカーとしての有用性に関する検討 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
6. 井上聡[パネルディスカッション]ゲノムと骨：エストロゲンシグナル (2003.7.3-5) 第 23 回日本骨形態計測学会 (東京)
7. 井上聡：[シンポジウム]男性ホルモンと骨—女性ホルモン受容体遺伝子改変動物の骨における雌雄差— (2003.10.10) 第 5 回日本骨粗鬆症学会 (福岡)
8. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲン受容体標的因子の同定とその機能 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
9. 保母るつ子、池田和博、竹田省、井上聡：エストロゲンによって誘導される Cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide (COX7RP) の発現機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
10. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
11. 市川智恵、堀江公仁子、津久井通、堺隆一、井上聡：プロテオーム解析による骨芽細胞様細胞におけるビタミン K 分子標的の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
12. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由起子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、丕泰壽、村松正實、井上聡：ER α および ER β の生体内 Gain of function による生殖機能の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
13. 井上聡：[シンポジウム] 核内情報受容から遺伝子発現への機構-病態とその治療の分子レベルでのアプローチ：

- エストロゲン受容体応答遺伝子の病態と治療標的における役割 (2004.3.29-31) 日本薬学会第 124 年会 (大阪)
14. 星野眞二郎、井上聡、大内尉義：男性における骨粗鬆症の検討 (2004.4.8-10) 第 101 回日本内科学会 (東京)
 15. 浦野友彦、藤田雅代、白木正孝、星野眞二郎、大内尉義、井上聡：Wnt-beta-catenin シグナル伝達因子における遺伝子多型が骨量に与える影響 (2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
 16. 木下博之、成沢研一郎、中村利孝、吉田英世、鈴木隆雄、大内尉義、井上聡、細井孝之：高齢女性の退行性脊椎病変における遺伝的素因の解析 (2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
 17. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 Efp 結合蛋白の探索とその機能解析 (2004.6.24-26) 第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
 18. 井上聡：[ランチョンセミナー] 骨代謝におけるビタミン K の作用メカニズムとその役割 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会 (大阪)
 19. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体 (SXR) ならびにビタミン K の新しい標的分子とその作用 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会学術集会
 20. 佐久間道子、赤平純平、鈴木貴、井上聡、伊藤潔、森谷卓也、笹野公伸、八重樫伸生：上皮性卵巣癌における Estrogen responsive RING finger protein (efp) の発現とその臨床病理学的意義 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
 21. 江見充、須藤悦弘、梶田満子、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一：プロオピオメラノコルチン遺伝子 (POMC) の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
 22. 須藤悦弘、梶田満子、中島敏晶、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一、江見充：IkB キナーゼ α および β 遺伝子 (IKKA, IKKB) の遺伝子多型と成人女性補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
 23. 梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一、江見充：破骨細胞随伴受容体遺伝子 (OSCAR) の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
 24. 江面陽一、梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充： α -アデューシン遺伝子 (ADDI) の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
 25. 菱沼俊樹、池田和博、井上聡：Gene structure and interferon inducible expression of human ifp1 (2004.10.13-16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
 26. 藤田雅代、浦野友彦、大内尉義、井上聡：骨芽細胞の増殖ならびに分化過程におけるステロイド応答遺伝子群の探索 (2004.11.17-20) 第 6 回日本骨粗鬆症学会 (大宮)
 27. 井上聡：[ワークショップ] 性ホルモン標的因子の同定とその機能 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 28. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体 (SXR) を介したビタミン K の標的分子とその作用 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)